

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 743 075

(21) N° d'enregistrement national : **95 15650**

(51) Int Cl⁶ : C 07 K 2/00, A 61 K 35/02

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 28.12.95.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 04.07.97 Bulletin 97/27.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS ETABLISSEMENT
PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH — FR.

(72) Inventeur(s) : LOPEZ EVELYNE, GIRAUD MICHEL,
BERLAND SOPHIE, MILET CHRISTIAN et
GUTIERREZ GILLES.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : REGIMBEAU.

(54) PROCÉDE DE PREPARATION DE SUBSTANCES ACTIVES A PARTIR DE LA NACRE, PRODUITS OBTENUS,
UTILES NOTAMMENT COMME MEDICAMENTS.

(57) La présente invention concerne un procédé de prépa-
ration de substances biologiquement actives, caractérisé
en ce que:

- a) on réduit de la nacre en une poudre de granulométrie
inférieure à environ 200 µm,
- b) on la met en contact intime avec un solvant aqueux,
- c) à la fin de la période de contact, on sépare la fraction
insoluble de façon à récupérer la fraction aqueuse,
- d) on concentre le solvant de la fraction aqueuse de ma-
nière à récupérer la fraction soluble de la nacre qui est
constituée des substances biologiquement actives, essen-
tiellement dépourvues de constituants minéraux.

Elle concerne également les produits susceptibles d'être
obtenus par ce procédé, leur utilisation à titre de médica-
ment et les compositions les contenant.

FR 2 743 075 - A1



La présente invention se rapporte à un procédé de préparation de substances biologiquement actives à partir de la nacre et aux utilisations des produits purifiés pouvant être ainsi obtenus.

Ces produits seront notamment utiles en chirurgie osseuse et
5 notamment en maxillo-faciale ou pour le traitement des pathologies dégénératives du cartilage, mais aussi en dermatologie.

La nacre a été proposée comme matériau de substitution et/ou de régénération osseuse, en particulier en chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale, mais aussi pour la fabrication d'implants dentaires.

10 Il a en outre été démontré (Lopez et al, Tissue and Cell, 24, 667-679, 1992) que la nacre exerçait à distance des effets ostéoconducteur et ostéogène sur des cellules osseuses in vitro.

Il était donc souhaitable de pouvoir isoler les substances biologiquement actives présentes dans la nacre.

15 On sait que la nacre, ou aragonite chonchylifère, est une formation minéralisée biogène ; elle est constituée d'une matrice organique de substances fibreuses et non fibreuses représentant environ 1,7% de la masse totale (Taylor et al, Bulletin of the British Museum (Natural history) Zoology. Suppl. 3. 125pp. + 29 Planches, 1969) et de carbonate de calcium
20 cristallisé sous forme d'aragonite. La structure de la nacre présente donc des similitudes avec celle de l'os, qui comprend une matrice organique et une phase minérale, constituée de phosphate de calcium sous forme d'hydroxyapatite. Par contre, environ 50% de la matrice organique de la nacre est soluble.

25 Des auteurs ont décrit l'extraction de protéines actives sur la formation de l'os, les BMP (ou Bone Morphogenetic Proteins) à partir de la fraction insoluble de la matrice de l'os (Urist et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 : 1828-1832, 1979). Ce procédé fait intervenir une déminéralisation acide qui entraîne des risques de dénaturation des produits d'intérêt.

30 Bien que la nacre ait été suggérée comme biomatériau depuis longtemps, des protéines analogues aux BMPs, par exemple, n'ont jamais été mises en évidence.

La Demanderesse a maintenant trouvé un procédé permettant de séparer des substances présentant un ensemble de propriétés biologiques particulièrement intéressantes en particulier car il ne comporte pas d'étape dénaturante.

5 C'est pourquoi la présente invention a pour objet un procédé de préparation de substances biologiquement actives à partir de la nacre, caractérisé en ce que :

- a) on réduit de la nacre en une poudre de granulométrie inférieure à environ 200 μm (c'est-à-dire en général de 50 à 150 μm),
- 10 b) on la met en contact intime avec un solvant aqueux, éventuellement additionné de sels,
- c) à la fin de la période de contact, on sépare la fraction insoluble de façon à récupérer la fraction aqueuse,
- d) on concentre le solvant de la fraction aqueuse de manière à
15 récupérer la fraction soluble de la nacre qui est constituée des substances biologiquement actives, essentiellement dépourvue de constituants minéraux.

Il s'agit d'un procédé simple à mettre en oeuvre, qui est de préférence réalisé à une température comprise entre environ 4° C et 30°
20 C ; de bons résultats sont obtenus à température ambiante.

La nacre utilisée peut être obtenue à partir de coquilles de mollusques, notamment d'huîtres telles que *Pinctada maxima*. On utilise la nacre brute, débarrassée des autres éléments de coquille riches en calcite ; de préférence, on part de nacre blanche, sinon il faut prévoir une étape
25 d'élimination des pigments.

Il s'agit d'une matière première aisément disponible, dont l'utilisation n'a pas d'impact négatif sur les populations naturelles ; en effet, la plupart de ces huîtres ou autres mollusques nacriers font l'objet d'une aquaculture.

30 De plus, un avantage supplémentaire est donné par le fait que la matière première peut être obtenue à partir de coquilles d'huîtres ayant produit des perles ; en effet, une huître perlière est éliminée du pool productif après avoir produit successivement au maximum 3 perles, alors qu'elle possède une épaisse couche de nacre de qualité excellente (grade
35 A). La présente invention propose donc un débouché supplémentaire pour une utilisation de la nacre en aval de la perliculture.

La nacre peut être utilisée sans décontamination préalable. Les fractions biologiques purifiées, extraites de la nacre, provenant de bivalves grands filtreurs (800 l eau/jour) sont exemptes d'agents pathogènes susceptibles d'être actifs chez l'humain, ce qui constitue une part essentielle du cahier des charges d'un biomatériau implantable, dont l'innocuité, à court et à long terme est une préoccupation majeure actuellement. Cette préoccupation se justifie par le souci de pallier les pathologies graves pouvant se déclarer à la suite de l'utilisation, en chirurgie osseuse par exemple, d'os lyophilisé.

10 Dans un des modes de mise en oeuvre du procédé la nacre est amenée à une granulométrie comprise entre 50 et 100 μm .

Dans un autre mode de mise en oeuvre, la nacre est réduite en une poudre de granulométrie comprise entre 15 et 50 μm , ce qui permet d'améliorer le rendement, en approchant de la taille de l'unité cristalline.

15 Dans tous les cas, on procédera d'abord à un concassage suivi d'un meulage, un broyage simple n'étant pas adapté à la consistance du matériau de départ.

20 Le solvant de l'étape b) peut être choisi parmi l'eau pure, bidistillée ou apyrogène, ou additionnée de sels choisis notamment parmi NaCl ou le chlorhydrate de guanidine.

L'invention a en effet permis de mettre en évidence que les substances responsables de l'activité biologique de la nacre sont hydrosolubles, et peuvent être extraites dès la première étape du fractionnement, sous réserve de traiter la nacre finement broyée, ce qui en limite le coût de production.

25 Le produit susceptible d'être obtenu directement par le procédé défini précédemment comprend un mélange de protéines, qui présentent des activités biologiques de stimulation de la prolifération cellulaire, en particulier des ostéoblastes, des chondrocytes, des kératinocytes et des fibroblastes. Ces protéines peuvent être fibreuses ou non. L'invention concerne non seulement le produit ainsi obtenu mais les diverses substances purifiées par fractionnement à partir du produit soluble complet.

Elle comprend notamment des protéines, pouvant être assimilées à des protéines ancestrales, apparentées à la famille des BMP/TGF β (transforming growth factor).

5 Plus particulièrement, l'invention a pour objet une ou des protéines ostéoinductrices non fibreuses susceptibles d'être obtenues à partir de la nacre, et qui présentent les caractéristiques suivantes:

- elle sont solubles dans l'eau,
 - elle sont non cytotoxiques,
 - elles augmentent l'activité phosphatase alcaline et la synthèse de
- 10 collagène de type I par les ostéoblastes.

Elle concerne également des séquences nucléotidiques codant pour une telle protéine. Il doit être entendu que de telles protéines, obtenues d'une autre source ou par synthèse in vivo, par des organes ou

15 tissus isolés ou par des cellules en culture sont également comprises dans l'invention, de même que les produits obtenus par synthèse chimique ou par génie génétique.

Le produit biologiquement actif peut être concentré à l'étape d) par dialyse et/ou lyophilisation.

20 Dans une variante du procédé, après l'étape d) on effectue une précipitation par l'éthanol et l'on récupère le culot qui constituera une sous-fraction biologiquement active, les produits restés en solution constituant une autre sous-fraction biologiquement active.

L'étape b) peut notamment être effectuée par mise en suspension de la poudre de nacre dans le solvant aqueux, sous agitation

25 mécanique ; on peut procéder à 4° C pendant 24 heures, mais les durées et les températures peuvent être adaptées, par l'homme du métier, par exemple en fonction de la granulométrie de départ.

Dans un autre mode de réalisation, l'étape b) est effectuée par passage sous pression du solvant à travers la poudre de nacre

30 immobilisée. Cette immobilisation peut par exemple être effectuée par une colonne, de type CLHP, éventuellement en mélange avec des substances de charge permettant une meilleure diffusion du solvant et évitant le compactage de la poudre de nacre.

Les différents produits obtenus selon l'invention sont utiles à titre d'implant ou de médicament, notamment destiné à augmenter la régénération des tissus notamment osseux, cartilagineux ou cutanés.

Les domaines d'application sont multiples et comprennent :

5

* Divers tissus :

- tissus squelettiques : os, cartilages, ligaments, dents, ciment, ivoire et tous les autres,
- tissus cutanés et sous-cutanés,
- 10 - tous les autres.

* Diverses pathologies :

- vieillissement dégénératif, traumatique, tumoral, esthétique et handicaps,
- 15 - infections rhumatologiques dont arthrose, polyarthrite...,
- infections orthopédiques (traumatologiques et à visées correctrices),
- pathologies du métabolisme calcique,
- infections dermatologiques et dermatocosmétologiques,
- 20 - ou autres...

Les produits selon l'invention pourront notamment être utilisés en chirurgie, en radiologie interventionnelle et dans toutes autres techniques de traitement.

25

Divers modes d'application pourront être envisagés par voie générale ou locale, avec visée d'effet action immédiate ou avec visée d'effet action retardée.

30

Les produits et protéines selon l'invention peuvent entrer dans des compositions pharmaceutiques. Celles-ci peuvent se présenter sous différentes formes telles que : solutions, suspensions, lyophilisats, poudres, gels, pâtes, colles, visqueux, non visqueux, revêtements, enduits, etc.

Elles pourront être utilisées par exemple dans les cas suivants:

- * Pour des interventions sous imagerie
- 5 - restauration osseuse locale (perte de substance) ou diffuse (déminéralisation) ; au niveau du rachis, des membres (os compact, os spongieux), des os plats de la face et de la boîte crânienne, du squelette thoracique ou autres.
- restauration cartilagineuse, disques intervertébraux et surfaces articulaires, suite par exemple à des destructions de type
- 10 arthrosique ou traumatologique ou autres.
- * Traitement des pathologies diverses des tissus squelettiques
- dans tous les cas cités précédemment, en chirurgie classique
- fabrication des greffons osseux "au modèle" en in vitro, par
- 15 stimulation d'ostéoblastes ou de fibroblastes (ostéoinduction).
- * Traitement des pathologies dermatologiques
- par application locale
- par intervention chirurgicale (injection, greffe ou autre...)
- après production in vitro de greffons cutanés
- 20 * Dans les cas d'autogreffe de cellules osseuses, pour contribuer à stimuler et maintenir l'expression phénotypique de cellules humaines formatrices d'os (ostéoblastes) en culture. Ces ostéoblastes autologues sont destinés à être réimplantés sous la forme d'autogreffe.
- * Utilisation "per os", en vue de la régulation du métabolisme calcique.
- 25 Selon un aspect avantageux, la composition contient en outre un support solide biocompatible ; celui-ci sera dopé par l'addition en quantité définie, des produits biologiquement actifs. La composition pourra être utilisée comme matériau de comblement de façon à pouvoir restaurer le squelette dans les cas de perte et/ou défaut de substance
- 30 osseuse qu'ils soient d'ordre traumatologique, esthétique ou pathologique.

Selon un autre aspect, la composition contient des excipients adaptés pour une administration par voie cutanée. Elle pourra induire la cicatrisation et la régénération cutanée.

5 L'invention se rapporte également à la production d'anticorps dirigés contre les différentes fractions protéiques biologiquement actives, ces anticorps pouvant être marqués par radioactivité, fluorescence, réactif chromogène ou enzymatiquement.

Elle concerne la production de sondes marquées ou non.

10 Selon un autre aspect l'invention concerne des kits de diagnostic contenant un anticorps ou une sonde tels que définis précédemment.

Les produits et protéines selon l'invention peuvent entrer dans des compositions cosmétiques, destinées en particulier à lutter contre les effets du vieillissement.

15 Enfin l'invention comprend l'utilisation des substances et protéines hydrosolubles susceptibles d'être extraites de la nacre comme additifs de culture cellulaire, ainsi que des milieux de culture les contenant.

20 Exemple I : Extraction

De la nacre de *Pinctada maxima* sous forme de fragments irréguliers (fournie par la société EVM Développement, SARL, 5, rue Capron. 75018 PARIS. SIRET 38348098500019) est lavée à l'eau courante puis
25 par trois passages en eau distillée. Ces fragments sont mis sous forme micronisée, de granulométrie comprise entre 50 et 100 μm . La poudre obtenue est décontaminée aux rayons γ et est extraite, sans déminéralisation préalable, par agitation mécanique à 4° C pendant 24 heures, par de l'eau pure bidistillée ou de l'eau apyrogène ou une solution
30 de NaCl à 25 g/l ou par une solution aqueuse de chlorhydrate de guanidine (pH 7,4). Une fraction soluble est obtenue après filtration sous vide, concentrée par lyophilisation puis dialysée contre de l'eau avec une membrane de 40 mm de diamètre et de 12 000 à 14 000 Daltons de porosité. Une partie de la fraction obtenue est directement lyophilisée. L'autre
35 partie est précipitée par l'éthanol (24 heures à 4° C).

L'ensemble des opérations effectuées est résumé sur le diagramme suivant :

5

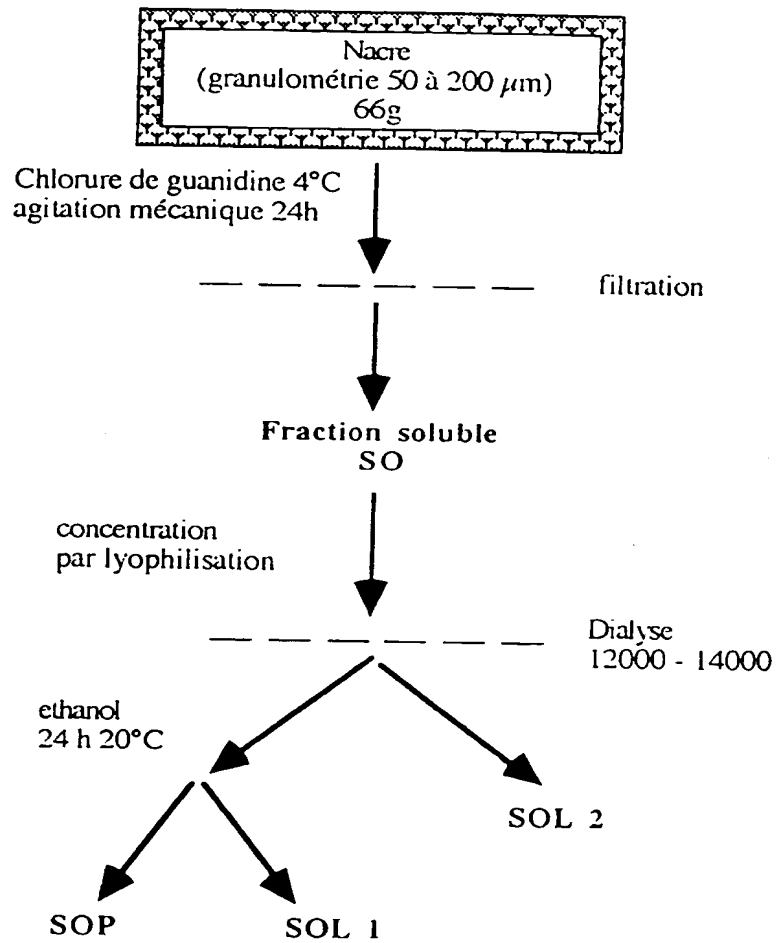
10

15

20

25

30



- Fractionnement, analyse des protéines et des peptides

Les spectres d'absorption en U.V. et l'analyse chromatographique des fractions brutes montrent que ces fractions sont essentiellement de nature protéique ou peptidique.

5 Les étapes principales du fractionnement de la matrice organique en ses divers constituants utilisent, en combinaison, les techniques classiques de chromatographie liquide haute pression (HPLC) et d'électrophorèse. L'exclusion par tailles (SEC), les échanges d'ions (IEX), les interactions hydrophobes (HIC), l'hydroxylapatite (HPHT), la
10 chromatographie d'affinité (AFC) sont les méthodes les plus courantes de HPLC. Ces méthodes sont considérées comme ne dénaturant pas les protéines ou peptides, donc ne provoquant pas d'altération de l'activité biologique.

Les techniques électrophorétiques pour l'analyse des
15 protéines sont l'électrophorèse capillaire de zone à haut pH (CZE), l'électrophorèse analytique et l'électrophorèse préparative. Toutes ces méthodes d'électrophorèse sont hautement résolutes et non dénaturantes.

20 **Exemple 2 : Tests biologiques in vitro**

- Matériel biologique expérimental

Ostéoblastes, chondroblastes, fibroblastes et kératinocytes humains en culture. Cellules de premier passage, provenant d'individus de
25 différents sexes et d'âge variable (enfant - adulte - personne âgée).

- Critères d'évaluation utilisés

1) Cytotoxicité, la prolifération et la migration des cellules est évaluée au moyen du test MTT, technique colorimétrique fondée sur la
30 transformation du sel de tétrazolium (jaune) en un sel de formazan (bleu violet) par la NADPH réductase des cellules vivantes.

2) Stimulation de l'activité des ostéoblastes maintenus à confluence, évaluée par augmentation de la présence et/ou de l'activité phosphatase alcaline.

3) Synthèse de collagène de type I par les ostéoblastes, de type II par les chondrocytes, de type III par les fibroblastes. Ces collagènes, constituants de la matrice extracellulaire peptidique, sont des marqueurs de l'activité de ces types cellulaires.

4) Synthèse de chondroïtine sulfate et d'acide hyaluronique, constituants de la matrice extracellulaire non peptidique sécrétée par les chondrocytes.

5) Fixation de calcium (processus de minéralisation) sur la matrice organique extracellulaire synthétisée par les ostéoblastes (évaluée par spectrophotométrie atomique d'absorption).

6) Synthèse de PTHrp par les kératinocytes.
A titre d'exemple :

Activité des Fractions : test d'activité sur ostéoblastes humains en culture

Extrait	MTT Différence par rapport au témoin	P. Alcaline Différence par rapport au témoin	Collagène Type I Expression
SOP	+	+	+++
SOL 1	+	NS	+++
SOL 2	+	+	++

NS= non significatif

Détermination des composants de la matrice organique
sur extraits :
Immunodétection après électrophorèse et transfert sur membrane
- sur extrait brut -

5

	Collagène type I	Collagène type II	Collagène type III	Décorine	PTHrp	CGrp
10	+++	++	+	+	+	+

Exemple 3 : In vivo : critères d'évaluation utilisés

15

- Démonstration de l'activité des fractions : le Test de SAMPATH (SAMPATH et al., 1990), utilisé pour la caractérisation de l'activité biologique (ostéoinduction) des Bone Morphogenetic Proteins (BMP) est choisi comme modèle.

20

	Site sous cutané Nacre totale (Poudre)	Collagène type II (1) Immunolocalisation	Collagène type I (2) Immunolocalisation	Phosphatase alcaline (3) Test d'activité
25	1 sem	+	-	-
	2 sem	+	+	+
30	4 sem	-	+	+

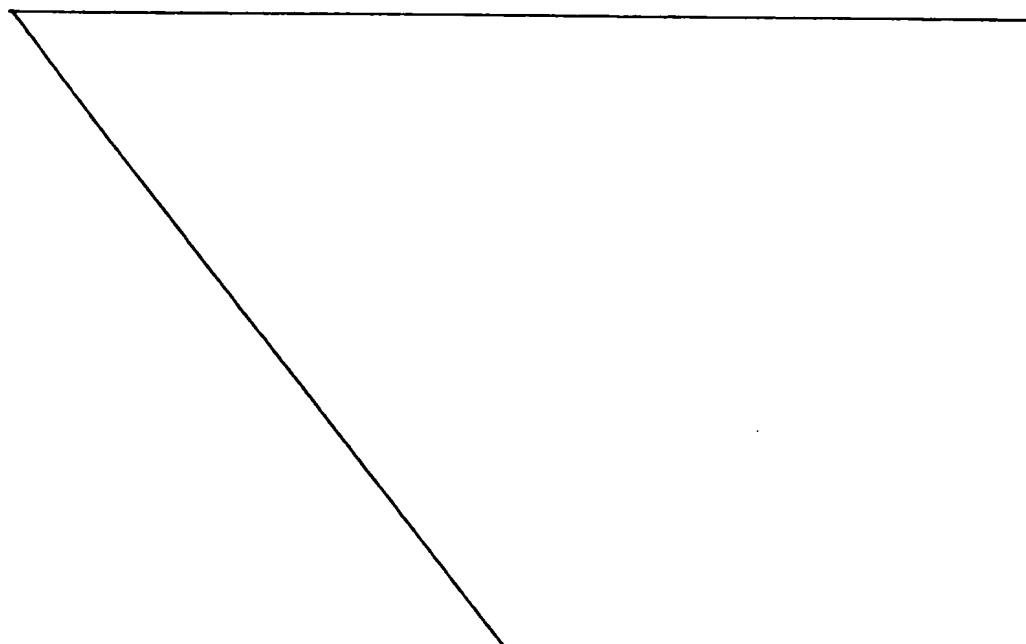
1) : spécifique du cartilage

2) : majoritaire dans l'os

3) : activité ostéoblastique

- Démonstration de l'activité sur la régénération cutanée : par application locale sur des lésions. (scarifications, brûlures ou autres) provoquées chez l'animal (rat, lapin).

5	Lésion cutanée provoquées (rat)		
	témoin sham operated	+ application Nacre totale (poudre)	
10	Inflammation chronique	+	-
	Cicatrisation à J+2	+/-	+++
15			



REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de substances biologiquement actives,
5 caractérisé en ce que :
- a) on réduit de la nacre en une poudre de granulométrie inférieure à environ 200 μm ,
 - b) on la met en contact intime avec un solvant aqueux,
 - c) à la fin de la période de contact, on sépare la fraction insoluble de
10 façon à récupérer la fraction aqueuse,
 - d) on concentre le solvant de la fraction aqueuse de manière à récupérer la fraction soluble de la nacre qui est constituée des substances biologiquement actives, essentiellement dépourvues de constituants minéraux.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'à l'étape a) la nacre est amenée à une granulométrie comprise entre 50 et 100 μm .
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'à l'étape a) la nacre est réduite en une poudre de granulométrie comprise
20 entre 15 et 50 μm .
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'à l'étape b), le solvant est choisi parmi l'eau pure, bidistillée ou apyrogène, ou additionnée de sels choisis notamment parmi NaCl ou le chlorhydrate de guanidine.
- 25 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'étape d) est effectuée par concentration puis dialyse et/ou lyophilisation.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'après l'étape d) on effectue une précipitation par l'éthanol et l'on
30 récupère le culot qui constituera une sous-fraction biologiquement active.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape b) est effectuée par mise en suspension de la poudre de nacre dans le solvant aqueux, sous agitation mécanique.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape b) est effectuée par passage sous pression du solvant à travers la poudre de nacre immobilisée.

5 9. Produits susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 à 8.

10 10. Protéines ostéoinductrices non fibreuses, analogues des BMPs ou autres, susceptibles d'être obtenues à partir de la nacre, qui présentent les caractéristiques suivantes :

- elles sont solubles dans l'eau,
- 10 - elle sont non cytotoxiques,
- elles augmentent l'activité phosphatase alcaline et la synthèse de collagène de type I par les ostéoblastes.

15 11. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un produit selon la revendication 9 ou une protéine selon la revendication 10.

12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle contient en outre un support solide biocompatible.

20 13. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle contient des excipients adaptés pour une administration par voie cutanée.

14. A titre de médicament, produits susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 à 8, ou protéines selon la revendication 11.

25 15. Utilisation d'un produit susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 8 ou d'une protéine selon la revendication 9, pour la préparation d'un médicament destiné à augmenter la régénération des tissus notamment osseux, cartilagineux ou cutanés.

30

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que le médicament est utile pour le traitement d'une affection choisie parmi : l'arthrose, la polyarthrite, l'ostéoporose, le vieillissement dégénératif, les pathologies tumorales et les pathologies post-traumatiques
5 telles que pseudoarthrose et algodystrophie.

17. Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un produit selon la revendication 9.

18. Milieu de culture de cellules, caractérisé en ce qu'il contient au moins un produit selon la revendication 9 ou une protéine
10 selon la revendication 10.

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2743075

N° d'enregistrement
nationalFA 524846
FR 9515650

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	FR-A-2 715 568 (VIRASSAMY JOSEPH) 4 Août 1995 -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61K C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
5 Septembre 1996		Rempp, G
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>----- & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 01.92 (P04C13)

BEST AVAILABLE COPY

This Page Blank (uspto)